

**TRIPTOFÁN ÉS BIZONYOS METABOLITJAINAK KONCENTRÁCIÓJÁNAK  
MEGHATÁROZÁSA CREUTZFELDT-JAKOB BETEGEKNEL**

**THE ASSESSMENT OF CONCENTRATIONS OF CERTAIN TRYPTOPHAN  
METABOLITES IN CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE**

**Edina Cseh<sup>1</sup>, Nikolett Nánási<sup>1</sup>, Gábor Veres<sup>1,2</sup>, Péter Klivényi<sup>1</sup>, Krisztina Danics<sup>3,4</sup>,  
László Vécsei<sup>1,2</sup>, Gábor G Kovács<sup>3,5</sup>, Dénes Zádori<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Department of Neurology, Faculty of Medicine, Albert Szent-Györgyi Clinical Center,  
University of Szeged, Szeged, Hungary*

<sup>2</sup>*MTA-SZTE Neuroscience Research Group, Szeged, Hungary*

<sup>3</sup>*Prion Disease and Neuropathology Reference Center, Semmelweis University, Budapest,  
Hungary*

<sup>4</sup>*Department of Forensic and Insurance Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary*

<sup>5</sup>*Institute of Neurology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria  
[cshedina.k@gmail.com](mailto:cshedina.k@gmail.com)*

**1. Abstract**

The kynurenine (KYN) pathway (KP), also known as the route where more than 95% of the tryptophan (TRP) is metabolized, in its steps of catabolism forms different metabolites which contribute to the neuroprotective–neurodegenerative changes in central nervous system. For this reason, TRP metabolism is extensively studied in neurodegenerative diseases (Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease, Huntington’s disease), where the neurologically active metabolite concentration changes are followed. Kynurenic acid (KYNA), which is an endogenous N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antagonist, is considered to be a neuroprotective agent.

In the present study TRP, KYN and KYNA were determined from human serum and cerebrospinal fluid (CSF) of patients with Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and age- and gender-matched controls, using high performance liquid chromatography (HPLC) applying UV and fluorescent detectors. The developed method was optimized and validated according to the International Congress Harmonization Guidelines.

The precision and recovery values ranged between 1.60-4.36%, 81.61-101.09%, respectively. There were no differences between the groups with regard all the measured metabolites.

The application of the developed validated method enabled the simultaneous determination of certain metabolites of the KP of TRP metabolism, but no evident alterations were found in patients with CJD.

**2. Bevezetés**

A triptofán (TRP) a 20 aminosav egyike, mely fontos szerepet játszik a központi és perifériás idegrendszerben található, sejtek működéséért felelős fehérjék szintetizálásában [1]. A kinurenin (*kynurenine*, KYN) útvonal (*kynurenine pathway*, KP) a TRP átalakulásának fő útja, 95%-a ezen az útvonalon metabolizálódik [2]. Ennek fontossága abban rejlik, hogy a KYN útvonalon a neurodegeneratív–neuroprotektív folyamatokért felelős neuroaktív vegyületek keletkeznek, mint például a 3-hidroxi-kinurenin (3-OHK), kinolinsav (*quinolinic acid*, QUIN) és a kinurénsav (*kynurenic acid*, KYNA) [3]. A KYNA az egyik ismert endogén

kompetitív antagonistája az N-metil-D-aszpartát receptornak, ezáltal a jelátvitelt képes módosítani és így a glutamáterg neurotranszmisszió során a káros folyamatok gátlásával neuroprotektív hatást fejt ki [4].

A 3-OHK és a QUIN neurotoxikus molekulák, amelyek hatásukat részben szabadgyökök képződésén keresztül fejtik ki, ez több idegrendszeri megbetegedés hátterében állhat, mint például Alzheimer-kór, Parkinson-kór és a Huntington-kór [5]. Az említett neurodegeneratív betegségek esetén több alkalommal is leírtak különböző elváltozásokat a KP-ben, melyek főleg a neuroaktív KP metabolitok koncentrációjában, valamint ezen anyagok keletkezését befolyásoló enzimek aktivitásának megváltozásában nyilvánultak meg [3].

A Creutzfeldt-Jakob betegség (*Creutzfeldt-Jakob disease*, CJD) ugyan egy ritka neurodegeneratív kórkép, de gyors, progresszív lefolyása miatt különös figyelmet igényel, és a kórképben végzett biomarker kutatások egyre nagyobb jelentőséggel bírnak [6]. Jelen tanulmányban a triptofán egyes metabolitjainak vizsgálatát tűztük ki célul. A KP szinten történő koncentrációváltozásokat egy validált metodika segítségével végezzük, UV és fluoreszcens detektorral (FLD) ellátott nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal.

### 3. Alkalmazott anyagok és módszerek

A standardsor készítéséhez az alábbi referenciavegyületeket alkalmaztuk: KYN, KYNA, TRP, 3-NLT, ez utóbbit, mint belső standardot (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok). A humán liquor minták mérési tartománya a fent említett 4 vegyületre 100-3000 nM, 1-100 nM, 5000-50000 nM és 500-5000 nM, míg a szérum esetén 100-5000 nM, 1-100 nM, 100-5000 nM és 500-7500 nM (standardsorok). E tartományban mért görbe alatti területek értékei egyenesen arányosak az ismert koncentráció értékekkel. Így tehát, a mért vegyületek görbe alatti területeivel arányos koncentrációértékeket a fenti tartományokra kapott lineáris összefüggés segítségével számoljuk ki.

A metodika beállítása egy korábban már részletezett módszer szerint történt, kis változásokkal [7]. Röviden, a mobilfázis 0.2 M cink-acetát-dihidrát/acetonitril = 95/5 (v/v%) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok; Scharlau, Barcelona, Spanyolország) arányú elegye, melynek pH-ját 6,2-re állítottuk be ecetsavval (VWR International, Radnar, PA, Amerikai Egyesült Államok). A mobilfázis áramlási sebessége 1,2 ml·min<sup>-1</sup> volt. A liquor kicsapásához trifluorecetsavat (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok), illetve a szérum kicsapásához perklórsavat (Scharlau, Barcelona, Spanyolország) alkalmaztunk. A mintákat kicsapás után 12000 rpm sebességgel centrifugáltuk, 4°C-on 10 percen keresztül (Hettich Mikro C200, Tuttlingen, Németország).

A mintákat FLD és UV/Vis detektorokkal felszerelt nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Amerikai Egyesült Államok) mértük. Az elválasztáshoz egy Security Guard előoszloppal ellátott fordított fázisú Kinetex C18 kromatográfiás oszlopot (Phenomenex Inc., Torrance, CA, Amerikai Egyesült Államok) használtunk. A beállított hullámhosszak UV detektor esetén a KYN és a 3-NLT mérésére 365 nm, illetve a fluoreszcens detektoron az excitációs hullámhosszak KYNA-ra valamint TRP-ra 344 és 254 nm voltak, az emissziós hullámhossz pedig 398 nm volt mindkét anyag esetében.

### 4. Kísérleti eredmények és kiértékelésük

#### 4.1. Metodika validálás

A validálás során meghatározott paraméterek eleget tesznek az ICH [8] által megfogalmazott biológiai mintákra vonatkozó követelményeknek. Ezek közé sorolható a

precizitás, érzékenység, szelektivitás, linearitás, meghatározási és kimutatósi határ, illetve a visszanyerési tényező.

Először a validálás paramétereit határoztuk meg. Úgy a szérum, mind a liquor minták esetén is szükségszerű az alkalmazott metodika validálása. A kalibráló görbe linearitását a fent említett standardsorok méréséből kapott görbe alatti területek és az ismert koncentrációk közötti viszony adja meg. A méréstartományt lefedő koncentrációjú minták linearitását az  $R^2$  értékkel határoztuk meg ( $R^2 > 0,99$ , alkalmazott szoftver: R Development Core Team, 2002). Ugyanezzel az összefüggéssel az érzékenységet ( $S'$ ) is meghatározzuk, melyről pontos adatot a görbe meredeksége (deriváltja) nyújt.

1. Táblázat A mérési tartomány és az érzékenység

LIQUOR	KYN	KYNA	TRP	3-NLT
koncentráció tartomány, nM	100-3000	1-100	5000-50000	500-5000
$R^2$	0,9989	0,9985	0,9999	0,9991
$S'$	0,0127	4,7295	0,4242	4,6725
SZÉRUM	KYN	KYNA	TRP	3-NLT
koncentráció tartomány, nM	100-5000	1-100	100-5000	500-7500
$R^2$	0,9998	0,9917	0,9999	0,9999
$S'$	0,00405	1,2386	0,106	0,0022

A precíz működés igazolásához ugyanazon mintaoldat többszöri elemzésének megismétlése szükséges, végül pedig a tapasztalati szórással (*relative standard deviation*, RSD%) adjuk meg a 6-szor párhuzamosan mért natív minta (N) eredményeit. Továbbá szükséges a natív minta olyan oldatokkal való kicsapása, melyben az analitok is megtalálhatóak ismert koncentrációkban. Így az egyik oldat alacsony koncentrációban (S1), míg a másik oldat magasabb koncentrációkban (S2) tartalmazza az analitokat, és mindegyik oldat 3 párhuzamos mérésével határozzuk meg a visszanyerési tényezőt (*recovery factor*, RF%).

## 2. Táblázat A precizitás és visszanyerési tényező

LIQUOR	KYN	KYNA	TRP
N átlag, nM	52,07	4,01	1316,20
<b>Precizitás, RSD%</b>	3,87	4,36	1,60
S1 átlag, nM	424,49	4,37	422,59
Valós koncentráció, nM	500	5	500
<b>RF %</b>	84,90	93,06	84,52
S2 átlag, nM	861,84	19,50	914,65
Valós koncentráció, nM	1000	20	1000
<b>RF %</b>	86,18	97,52	91,46

SZÉRUM	KYN	KYNA	TRP
N átlag, nM	369,25	7,30	1605,46
<b>Precizitás, RSD%</b>	3,18	4,02	2,97
S1 átlag, nM	496	3,35	5479,32
Valós koncentráció, nM	500	4	6000
<b>RF %</b>	99,21	81,61	91,32
S2 átlag, nM	960,58	11,36	10108,60
Valós koncentráció, nM	2000	12	10000
<b>RF %</b>	96,06	94,69	101,09

A meghatározási határ (*limit of quantification*, LOQ) azt a legkisebb koncentrációt jelenti, mely még megfelelő precizitással és helyességgel meghatározható, míg a kimutatási határ (*limit of detection*, LOD) az alapzaj háromszorosának megfelelő magasságú jelet adó koncentráció. A fenti két paramétert a következő képletekkel határoztuk meg ( $\sigma$ : a vakminta szórása,  $S'$ : érzékenység)

$$\text{LOD} = 3.3 \sigma/S', \text{ illetve } \text{LOQ} = 10 \sigma/S'$$

## 3. Táblázat A meghatározási és a kimutatási határ értékei

		KYN	KYNA	TRP
LIQUOR	LOD (nM)	27,61	1,28	430
	LOQ (nM)	91,08	4,27	1440
SZÉRUM	LOD (nM)	160	3,21	47,8
	LOQ (nM)	484	9,73	145

## 1.2. Triptofánmetabolitok mérése

Az adatok feldolgozására szolgáló minták között 5 CJD, illetve 5 kontroll (CO) szérum és liquor minta található. A CJD és a CO betegek összehasonlítása a TRP metabolitjainak

koncentráció szintjén történt a 46/2014. sz. intézményi etikai engedély birtokában, az adatokat az 5. táblázat mutatja.

5. Táblázat A vizsgálat triptofánmetabolitok átlagos koncentráció szintjei

Vizsgált metabolitok		KYN	KYNA	TRP
		c (nM)	c (nM)	c (nM)
Liquor	CJD-csoport	35,95	1,48	1816,66
	CO-csoport	<LOD	2,88	1919,26
Szérum	CJD-csoport	2093,02	35,97	54646,87
	CO-csoport	1569,40	14,86	49923,38

A KP során keletkező TRP, KYN, KYNA és a koncentráció szinteket mértük, amely mérés során nem észleltünk szignifikáns változásokat, t-tesztek alkalmazásával az alábbi  $p$ -értékeket kaptuk: liquor minták esetén  $p_{\text{KYN,LI}} = 0,7558$ ;  $p_{\text{KYNA,LI}} = 0,3516$ ;  $p_{\text{TRP,LI}} = 0,9589$ . Szérum esetén  $p_{\text{KYN,SE}} = 0,919$ ;  $p_{\text{KYNA,SE}} = 0,6996$ ;  $p_{\text{TRP,SE}} = 0,6659$ .

### Következtetések

A kísérletek során sikerült validálni az alkalmazott metodikákat, melyek a humán liquor és szérum mérések kiértékelésére szolgáltak. A validálás során kapott értékek a metodikánk robusztusságára utalnak. A precizitás egyik esetben sem haladta meg az  $\text{RSD} \leq 4.5\%$  értéket, míg a visszanyerési tényezők 81%-102% közöttiek voltak. A TRP metabolizmusának KP-t tanulmányozva, a kis elemszámból adódó korlátok mellett, nem találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált metabolitok koncentrációjában CJD-s egyének értékeit a kontroll csoport értékeivel összehasonlítva, mely eredmények ezen útvonal CJD-ben való érintettségét nem támogatják.

### Köszönetnyilvánítás

A kutatás a GINOP-2.3.2-15-2016-00034 és EFOP-3.6.1-16-2016-00008 pályázatokból valósult meg. Dr. Zádori Dénest a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíja támogatja.

### Irodalomjegyzék

- [1] K. Sarkhosh, E.E. Tredget, Y. Li, R.T.Kilani, H. Uludag, A. Ghahary, Wound Repair Regen., 11 (2003) 337.
- [2] H. Wolf, Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl., 136 (1974) 1.
- [3] R. Schwarcz, J.P. Bruno, P.J. Muchowski, H.Q. Wu, Nat. Rev. Neurosci. 13 (2012) 465.
- [4] L. Vécsei, L. Szalárdy, F. Fülöp, J. Toldi, Nat. Rev. Drug. Disc. 12 (2012) 64.
- [5] G.J. Guillemin, FEBS J., 279 (2012) 1356.
- [6] G.G. Kovacs, U. Andreasson, V. Liman, G. Regelsberger, M.I. Lutz, K. Danics, E. Keller, H. Zetterberg, K. Blennow, E. J. Neurol, (2017) 1.
- [7] C. Herve', P.Beyne, H. Jamault, E. Delacoux, J. Chromatogr. B. Biomed. App. 675 (1996) 157.
- [8] ICH harmonised tripartite guideline, validation of analytical procedures. Fed Regist., 1995 (60) 11260.